

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/82, 15/53, 9/02, 5/10, G01N 33/50, A01H 5/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/04021
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	28. Januar 1999 (28.01.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/03832		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HU, ID, IL, JP, KR, KZ, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, UZ, VN, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 23. Juni 1998 (23.06.98)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 197 30 066.9 14. Juli 1997 (14.07.97) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SEULBERGER, Harald [DE/DE]; Speyerer Wingert 25, D-67141 Neuhofen (DE). LERCHL, Jens [DE/DE]; Im Steg 36, D-68526 Ladenburg (DE). SCHMIDT, Ralf-Michael [DE/DE]; Am Schloßgarten 9d, D-67489 Kirrweiler (DE). KRUPINSKA, Karin [DE/DE]; Gyrhofstrasse 15, D-50931 Köln (DE). FALK, Jon [DE/DE]; Feldhuhnweg 23, D-50127 Bergheim (DE).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).			
(54) Title: DNA SEQUENCE CODING FOR A HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE AND OVERPRODUCTION THEREOF IN PLANTS			
(54) Bezeichnung: DNA-SEQUENZ CODIEREND FÜR EINE HYDROXYPHENYLPYRUVATDIOXYGENASE UND DEREN ÜBERPRODUKTION IN PFLANZEN			
(57) Abstract The invention relates to a method for producing plants with an increased yield of vitamin E from biosynthesis by overexpression of a plant HPPD gene from barley.			
(57) Zusammenfassung Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Vitamin E Biosyntheseleistung durch Überexpression eines pflanzlichen HPPD-Gens aus Gerste.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

DNA-Sequenz codierend für eine Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase und deren Überproduktion in Pflanzen

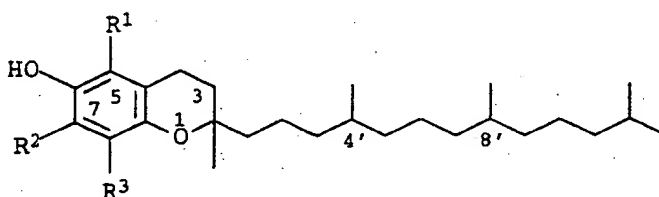
5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt durch Expression eines exogenen oder endogenen HPPD-Gens in Pflanzen oder Pflanzen-
 10 teilen. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der entsprechenden Nukleinsäuren kodierend für ein HPPD-Gen in transgenen Pflanzen, um diese resistent gegenüber Hemmstoffen der HPPD zu machen, sowie die Verwendung der DNA-Sequenz codierend für eine HPPD zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung
 15 von Inhibitoren der HPPD.

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant wäre auch die Ent-
 20 wicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes.

Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's
 25 Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a - d) stammt von Tocol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols (2a - d):

30

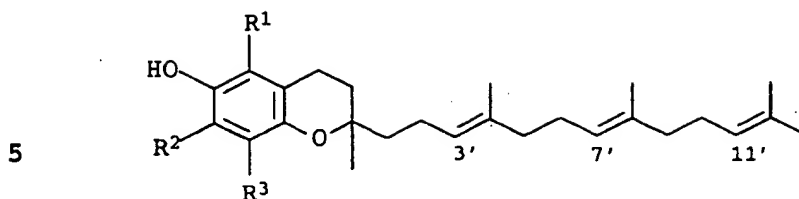


35

- 1a, α -Tocopherol: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 1b, β -Tocopherol [148-03-8]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$
 40 1c, γ -Tocopherol [54-28-4]: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 1d, δ -Tocopherol [119-13-1]: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

45

2



- 2a, α -Tocotrienol [1721-51-3]: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 10 2b, β -Tocotrienol [490-23-3]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$
 2c, γ -Tocotrienol [14101-61-2]: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 2d, δ -Tocotrienol [25612-59-3]: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt α -Tocopherol.

15

- Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits der Vitamin E-Gehalt bereits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können
 20 nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch
 25 wäre die Erhöhung des Vitamin E Gehaltes durch Kreuzung auf Pflanzen der selben Art beschränkt.

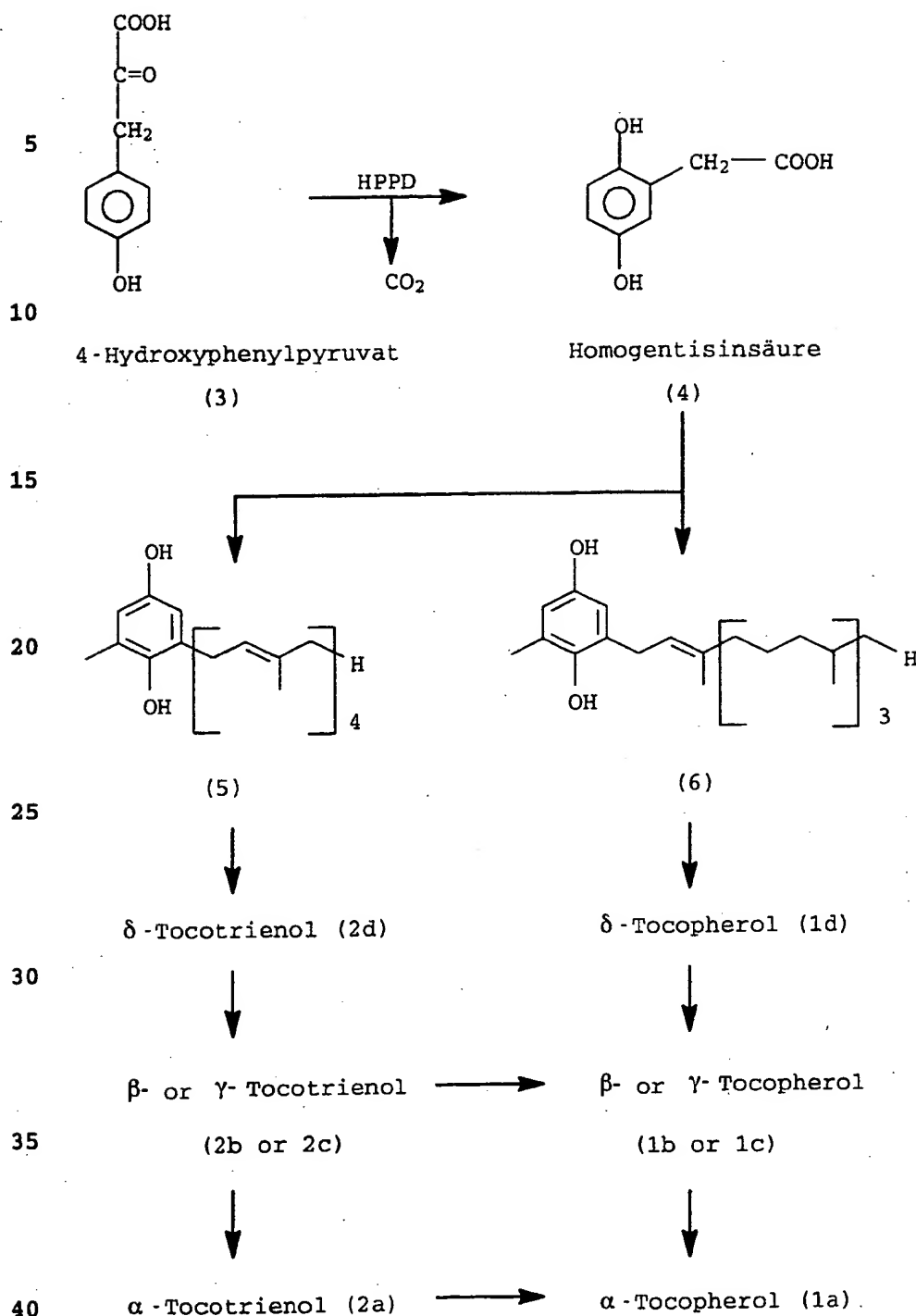
- Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, ein für die Vitamin E Syntheseleistung kodierendes, essentielles Biosynthese-
 30 gen zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, identifiziert werden.

35

Die Tocopherol-Biosynthese in Pflanzen und Algen verläuft bekannt wie folgt:

40

45



Vorstufe des aromatischen Rings der Tocopherole ist p-Hydroxyphenylpyruvat (3), das enzymatisch mit Hilfe des Enzyms Hydroxyphenylpyruvatoxygenase (HPPD) in Homogentisinsäure (4) umgewandelt wird, die mit Phytylpyrophosphat unter Eliminierung von CO_2 zur Vorstufe (6) reagiert. Der Tocotrienolbiosyntheseweg

4

beginnt mit der Kondensation von Homogentisinsäure(4) mit Geranylgeranylpyrophosphat zur Vorstufe (5). Die enzymatische Cyclisierung der Vorstufen 5 oder 6 führt zu δ - Tocotrienol bzw. zu δ - Tocopherol. Einige dieser Biosyntheseenzyme wurden isoliert.

5

Bei der Suche nach Arabidopsis-Mutanten, die Defekte in der Carotinoidbiosynthese aufweisen, wurde eine Mutante mit weißem Phänotyp identifiziert, die keine aktive HPPD bilden kann. Wenn die als *pds2* bezeichnete Mutante in Gegenwart von Homogentisinsäure
 10 angezogen wird, bildet sie wie der Wildtyp Carotinoide und ergrünt (Norris et al., Plant Cell (1995) 7: 2139 - 2149). Diese Untersuchung zeigt, daß die Aktivität der HPPD Voraussetzung für die Ausbildung photosynthetisch aktiver Chloroplasten ist. Ohne dieses Enzym werden keine Plastochinone gebildet, die als Akzeptoren für freigesetzte Reduktionsäquivalente während der Carotinoidbiosynthese erforderlich sind (Phytoendesaturierung). Die Schlüsselrolle der HPPD im plastidären Stoffwechsel macht sie zu einem interessanten Target für Herbizide. Sulcotrione hemmen die Aktivität des Enzyms effektiv (Schultz et al., FEBS Lett. (1993)
 15 318: 162 - 166).

Von den im folgenden genannten Organismen sind bereits Sequenzen HPPD spezifischer Gene bekannt:

25

Organismus	Sequenzname	Zugangsnummer Datenbank
Mensch	HPPD_HUMAN	X72389
Schwein	HPPD_PIG	D13390
30 Ratte	HPPD_RAT	M18405
Maus	HPPD_MOUSE	D29987
Streptomyces avermitilis	SA11864	U11864
35 Pseudomonas sp. strain P.J. 874	HPPD_PSESP	P80064
Arabidopsis	HPPD_ARAB1	AF900228
	HPPD_ARAB2	U89267

40 Desweiteren sind folgende Sequenzen mit deutlicher Homologie zu HPPD-Sequenzen in den Datenbanken zu finden:

PEA3_MOUSE: Mus muscula (Maus) PEA3 polypeptide, AC X63190;

45 MELA_SHECO: Shewanella colwelliana, mela Protein, AC M59289,

5

In WO 96/38567 wird die HPPD DNA-Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* und *Daucus carota* beschrieben.

Sowohl für die Anwendung im Pflanzenschutz zur Erzeugung Herbizid-resistenter Pflanzen als auch für die Erhöhung der Vitamin E-Synthese in Pflanzen - beispielsweise zur Erzeugung von Futtermitteln mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt - ist die Kenntnis der HPPD-DNA-Sequenzen unbedingte Voraussetzung.

- 10 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer gegen Inhibitoren der HPPD resistenten transgenen Pflanze.

- 15 Beide Aufgaben wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines HPPD-Gens in den Pflanzen.

- Zusätzliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der HPPD.

- Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Expression eines HPPD-Gens aus Gerste in einer Pflanze bzw. einem Mikroorganismus und anschließende Testung von Chemikalien auf Hemmung der HPPD-Enzymaktivität.

- Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Klonierung des vollständigen HPPD-Gens aus Gerste über die Isolierung der für das HPPD-Gen spezifischen cDNA (HvSD36).

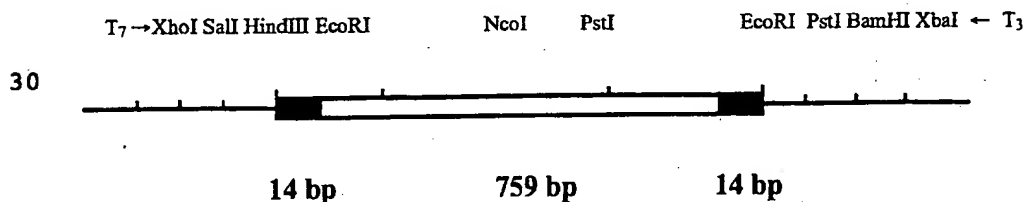
- Während der Blattseneszenz tritt eine deutliche Erhöhung des Vitamin E-Gehalts in den Blättern auf (Rise et al., Plant Physiol. (1989) 89: 1028 - 1030). Das monokotyle Blatt der Gerste stellt einen Gradienten von Zellen unterschiedlichen Alters dar, da das Blatt ein basal gelegenes Meristem hat, von dem sich sukzessive neue Zellen abspalten. Somit liegen die ältesten Zellen an der Spitze des Blattes und die jüngsten an der Basis. Abb. 1 zeigt eine schematische Zeichnung des Primärblattes der Gerste an verschiedenen Tagen nach Aussaat. Die ermittelte Gesamtlänge der Blätter ist in der Skala links zu entnehmen. Eingezeichnet und mit I - IV benannt sind die für die Analyse der Genexpression ausgewählten verschieden weit differenzierten Blattbereiche des Primärblattes. Die Pflanzen wurden in einem täglichen Licht/Dunkel-Wechsel (L/D) angezogen bzw. zur Induktion der Seneszenz nach 6 Tagen abgeschnitten und für 2 Tage dunkel (2 nd) inkubiert. Eine "Northern blot"-Analyse mit RNA aus

6

verschieden weit differenzierten Bereichen des Primärblattes der Gerste (siehe Abb. 2) deuten auf eine entwicklungsabhängig gesteuerte Expression der HPPD der Gerste hin. So findet eine starke Akkumulation des ca. 1600 nt langen Transkriptes im meristematischen Bereich an der Basis des Primärblattes (I) statt. Der Gehalt an diesem Transkript fällt mit zunehmendem Alter des Gewebes ab (IIa und IIb) und steigt in den voll ausdifferenzierten Zellen mit ausgereiften Chloroplasten (III) wieder an. In seneszierenden Bereichen des Primärblattes (IV) ist schließlich der Gehalt am 1600 nt langen Transkript am höchsten. Zusätzlich ist nur in den meristematischen Zellen an der Basis des Primärblattes ein ca. 3100 nt langes Transkript zu detektieren. Auch dieses Transkript ist in zunehmender Reifung des Gewebes nicht mehr nachweisbar.

Mit Hilfe des sogenannten "Differential Display"-Verfahrens wurde zunächst ein 207 bp cDNA-Fragment isoliert, dessen entsprechendes Transkript bei dunkelinduzierter Seneszenz im Primärblatt der Gerste akkumuliert. Dieses Fragment (Sequenzprotokoll: Sequenz ID NO:1: Nukleotidposition 1342 - 1549) wurde anschließend als Sonde verwendet, um in einer cDNA-Bank (in λ -ZAP-II) aus seneszierenden Farnenblättern der Gerste einen cDNA-Klon mit größerem Insert zu isolieren.

Schematische Darstellung des cDNA-Teilklons HvSD 36 aus der λ -ZAP-II-Bank:



Das cDNA-Fragment (Sequenzprotokoll: Sequenz ID NO:1: Nukleotidposition 771 - 1529) wurde in die EcoRI Schnittstelle von pBluescript(SK-) kloniert. An beiden Enden der cDNA befindet sich zusätzlich eine 14 bp Adaptorsequenz, die zur Ligation in den λ -ZAP-II benötigt wurde. Eingezeichnet sind ausgewählte Restriktionschnittstellen des Vektors sowie der cDNA selbst.

Das 759 bp lange cDNA-Fragment wurde als Sonde für einen weiteren Versuch verwendet, um eine vollständige Sequenz von HvSD 36 zu erlangen. Zu diesem Zweck stand eine cDNA Bank aus RNA des meristematischen Bereichs 5 Tage alter Gerstenkeimlinge zur Verfügung. Für diese cDNA Bank wurde der Lambda Phage ExCell Eco

RICIP von Pharmacia (Freiburg) (Produkt Nummer: 27-5011, 45.5kb) verwendet.

Es konnte ein 1565 bp langer cDNA-Klon isoliert werden, siehe
5 Sequenzprotokoll: Sequenz ID NO:1: und 2.

Die 434 Aminosäuren lange Proteinsequenz weist unter den in den Datenbanken befindlichen Sequenzen mit 58 % die höchste Homologie zur Sequenz der HPPD aus *Arabidopsis thaliana* auf.

10

Zur Auffindung eines genomischen Klones, der die vollständige Gensequenz der HPPD beinhaltet, wurde eine Lambda FIXII-Bank der Gerste von der Firma Stratagene (Heidelberg, Produkt Nummer 946104) bezogen. Zur Herstellung der Bank diente DNA aus

15 etiolierten Blättern der Wintergerste cv. Igri. Die DNA wurde partiell mit Sau3AI verdaut. Vor der Klonierung in die XhoI-Schnittstelle des Vektors erfolgte eine Auffüllung der Fragmentenden und der Phagenarme mit Nukleotiden. Die Durchmusterung der Bank mit 200.000 pfu in der ersten Runde ergab nur einen
20 Klon, der mit der cDNA HvSD36 hybridisierte. Nach Restriktionsverdau dieses rekombinanten Phagen mit PstI und SacI konnten anschließend Fragmente mit Größen von 5400, 3800 und 1800bp isoliert werden, die bei einer "Southern"-Blot-Hybridisierung mit der HvSD36-Sonde detektierbar sind. Diese Subfragmente liegen
25 kloniert im Bluescript-Vektor vor. Abbildung 3 zeigt den schematischen Aufbau des HPPD-Gens der Gerste.

Gegenstand der Erfindung sind insbesondere Expressionskassetten, deren Sequenz für eine HPPD oder deren funktionelles Äquivalent
30 kodiert, sowie deren Verwendung zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Vitamin E Gehalt. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine erfindungsgemäße Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine HPPD kodieren
35 und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Vitamin E verleihen.

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der
40 kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elementen-
45 te, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das HPPD-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor,

kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber
5 nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz
10 aus dem Tabak-Mosaic-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987) 8693 - 8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 4
15 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- 20 - OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- PNOS: Nopalin-Synthase-Promotor
- außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

25 Als Promotoren der erfindungsgemäßen Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der
30 CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980) 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al.,
35 EMBO J. 8 (1989) 2195 - 2202).

Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen HPPD-Gens in der Pflanze zu einem be-
40 stimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al.,
45 (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-

induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die
5 Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen
die Biosynthese von Vitamin E bzw. dessen Vorstufen stattfindet.
Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische
Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der
cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor
10 aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445 - 245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremd-
protein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten
löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen
15 exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995),
1090-1094). Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann daher
beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den
Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al.
Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) oder LEB4-Promotor
20 (Fiedler und Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu
exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten. Der
Aufbau einer derartigen Kassette ist in der Abbildung 4
schematisch beispielhaft dargestellt.

25 Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette
erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer
geeigneten HPPD-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen
Promotor und HPPD-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein
chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem
30 Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und
Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis,
E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory
Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
(1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist,
35 Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory,
Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al.,
Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc.
and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

40 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den
Apoplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das
Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen ent-
sprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment
des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev.
45 Plant Sci. 15, 4 (1996), 285 - 423). Für die Menge der Protein-
akkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen

hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al. , Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792).

- Gegenstand der Erfindung sind auch Expressionskassetten, deren
- 5 DNA-Sequenz für ein HPPD-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Besonders bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des HPPD-Gens in die Chloroplasten vom HPPD-Teil
- 10 enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.
- 15 Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine HPPD kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen
- 20 mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert
- 25 werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker ange-
setzt werden.
- 30 Zweckmäßigerweise können die erfindungsgemäßen Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der
- 35 Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der erfindungsgemäße Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch
- 40 fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die erfindungsgemäße Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den erfindungsgemäßen Promotor, eine beliebige DNA-Sequenz und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig
- 45 austauschbar.

11

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al. Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Eine erfindungsgemäße Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein HPPD-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38. Aus den

12

transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die erfindungsgemäße Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines HPPD-Gens enthalten.

- 5 Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine HPPD kodierenden DNA wird eine erfindungsgemäße Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.
- 15 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die erfindungsgemäßen Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184.
- 20 Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Transformation
- 25 von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes der Pflanze.

- Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch
- 30 in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

- 35 Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung der Vitamin E-Produktion eingesetzt werden.

- 40 Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplasten-
- 45 transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation

13

trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128 - 143 sowie in Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205 - 225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 8711).

Mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierte *Agrobakterien* können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer *Agrobakterienlösung* gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein HPPD-Gen kodieren, sind erfindungsgemäß solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepasste, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine HPPD kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation dieser Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

14

- Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft der Erhöhung des Vitamin E Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des HPPD-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-
- 5 Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die HPPD Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rücküber-
- 10 setzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden ver-
- trauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.
- 15 Als weitere erfindungsgemäße geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches HPPD-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Poly-
- 20 peptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf HPPD-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das HPPD-Protein an den
- 25 gewünschten Wirkort leitet.

Gegenstand der Erfindung sind aber auch die erfindungsgemäß erzeugten Expressionsprodukte sowie Fusionsproteine aus einem Transitpeptid und einem Polypeptid mit HPPD-Aktivität.

- 30 Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Vitamin E-Biosyntheseleistung durch funktionelle Überexpression des HPPD-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch
- 35 modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzen-generation.

- Der Biosyntheseort von Vitamin E ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des HPPD-Gens
- 40 sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Vitamin E-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze -beispielsweise in fett-
- haltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

15

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen HPPD-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

- 5 Die Wirksamkeit der Expression des transgen experimentierten HPPD-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des HPPD-Gens und deren Auswirkung auf die Vitamin E-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen
10 getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher
15 Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

- 20 Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.
Wie bereits erwähnt ist die HPPD ein geeignetes Target für Herbizide vom Typ der Sulcotrione. Um noch effizientere Hemmstoffe der HPPD finden zu können, ist es notwendig, geeignete
25 Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die komplette cDNA-Sequenz der HPPD aus Gerste in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen) kloniert und in *E. coli*
30 überexprimiert.

Das mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskassette exprimierte HPPD-Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die HPPD spezifischen Hemmstoffen.

- 35 Dazu kann die HPPD beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der HPPD in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und
40 quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide
45 Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es, reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Sub-

16

stanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Herbizide, die mit dem 5 oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.

Durch Überexpression der für eine HPPD kodierenden Gensequenz Seq ID NO: 1 in einer Pflanze wird eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD erreicht. Die derart hergestellten 10 transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- 15 - Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine erfindungsgemäße Expressionskassette in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- 20 - Verwendung einer Pflanze zur Herstellung pflanzlicher HPPD.
- 25 - Verwendung der erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD durch verstärkte Expression einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz.
- 30 - Verwendung der erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der HPPD.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, 35 ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Klonierungsverfahren

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gel- 40 elektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombi- 45 nanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring

Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-I Blue) wurden von Stratagene bzw. Pharmacia im Fall von NP66 bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850 kann) wurde von Deblaere et al. in (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4777) beschrieben. Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103 - 119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711 - 8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221 - 230) benutzt werden.

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

Erzeugung pflanzlicher Expressionskassetten

In das Plasmid pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. (1984) 12, 8711) wurde ein 35S CaMV Promotor als EcoRI-KpnI-Fragment entsprechend den Nukleotiden 6909 - 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus (Franck et al. Cell 21 (1980) 285) inseriert. Das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmides pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835), Nukleotide 11749 - 11939 wurde als PvuII-HindIII-Fragment isoliert und nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI-HindIII Schnittstelle des Vektors pBmAR-Hyg kloniert. Es entstand das Plasmid pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221 - 230).

Anwendungsbeispiele

40 Beispiel 1

Isolierung von HPPD-spezifischen cDNA Sequenzen

Mit Hilfe der von Liang und Pardee (Science (1992) 257, 967 - 972) publizierten Methode der DDRT-PCR wurde die Zusammensetzung der mRNA-Population aus Primärblättern von neun Tage in einem L/D-Wechsel (16 h Licht/ 8 h Dunkel) angezogenen Gerstenpflanzen

18

verglichen mit der von Primärblättern 11 Tage alter Gerstenpflanzen, in denen nach neun Tagen Anzucht anschließend Seneszenz durch zweitägige Dunkelbehandlung induziert wurde (Humbeck und Krupinska, J. Photochem. Photobiol. 36 (1996), 321 - 326).

- 5 Jeweils 0,2 µg der gesamten RNA wurde mit dem Enzym "Superskript RT" (Gibco BRL, Eggenstein) in cDNA umgesetzt. Dabei enthielten die Reaktionsansätze (20 µl) neben der RNA außerdem 20 µM dNTPs, 10 µM DTT, 1xRT-Puffer und je 1 µM (dT)₁₂VN-Primer. Die Synthese der für diese Reaktionen erforderlichen Anker-"Primer" erfolgte
- 10 aufgrund der Angaben von Liang und Pardee:

1. 5'-TTTTTTTTTTTAG-3'
2. 5'-TTTTTTTTTTTCA-3'
3. 5'-TTTTTTTTTTTAC-3'
- 15 4. 5'-TTTTTTTTTTTGT-3'

Nach Synthese der cDNAs erfolgte die Amplifikation der entsprechenden Sequenzen in jeweils zehn Ansätzen, die sich durch Verwendung der im folgenden angegebenen Zufalls-"Primer" unter-

- 20 scheiden:

- | | |
|------------------------|----------------------|
| 1. 5'-TACAACGAGG-3' | 2. 5'-GGAACCAATC-3' |
| 3. 5'-AAACTCCGTC-3' | 4. 5'-TGGTAAAGGG-3' |
| 5. 5'-CTGCTTGATG-3' | 6. 5'-GTTTTTCGCAG-3' |
| 25 7. 5'-GATCTCAGAC-3' | 8. 5'-GATCTAACCG-3' |
| 9. 5'-GATCATGGTC-3' | 10. 5'-GATCTAAGGC-3' |

Die PCR-Reaktionsansätze enthielten in einem Volumen von jeweils 20 µl 1xPCR-Puffer, 2 µM dNTPs, 2,5 µCi (α ³³P)-dATP, 1 µM

- 30 (dT)₁₂VN-"Primer", 1/10 Vol. RT-Mix (Sambrook et al. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 1989), 1 U Taq DNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim) und 1 µM 10-mer Zufalls-"Primer". Die PCR-Reaktionen liefen nach folgendem Programm in einem Uno-Block (Biometra) ab:

35

- | | | |
|-------|------|---|
| 1. | 94°C | 2 min |
| 2. | 94°C | 30 s |
| 3. | 40°C | 2 min |
| 4. | 72°C | 30 s |
| 40 5. | 72°C | 5 min |
| 6. | 4°C | Aufbewahrung bis zur weiteren Bearbeitung |

Die Schritte 2, 3 und 4 wurden 40-mal nacheinander durchgeführt. Dabei ergaben sich etwa 100 cDNA-Banden pro Reaktion und

- 45 "Primer"-Kombination.

19

Abweichend von der Vorschrift von Liang und Pardee erfolgte die Auftrennung der amplifizierten cDNA-Fragmente in nichtdenaturierenden Polyacrylamidgelen folgender Zusammensetzung: 6 % (w/v) Acrylamid (Long Ranger, AT Biochem), 1,2 x TBE-Puffer, 0,005 % (v/v) TEMED und 0,005 % (w/v) APS (Bauer et al, Nucl. Ac. Res. (1993) 21, 4272 - 4280).

- Je 3,5 µl jedes PCR-Ansatzes wurden mit 2 µl Probenpuffer (dye II, Sambrook et al., 1989) versetzt und dann auf das Gel aufgetragen.
- 10 Um die Reproduzierbarkeit der cDNA-Bandenmuster zu erfassen (Abb. 5), wurden von an den Tagen 9 und 11 geernteten Primärblättern der Gerste jeweils zwei unabhängige RNA-Präparationen angefertigt (9 und 9' bzw. 11 und 11') und parallel in der nachfolgenden Analyse eingesetzt. Dargestellt ist das Ergebnis für zwei
- 15 verschiedene Primerkombinationen (A und B), wobei exemplarisch zwei Unterschiede im Bandenmuster zwischen der Probe von Tag 9 und 11 durch Pfeile hervorgehoben wurden. Nur solche Banden, die in den beiden Proben aus seneszierenden Pflanzen gleichermaßen und in den beiden Vergleichsproben nicht vorkamen, wurden bei der
- 20 späteren Analyse der Gele beachtet. Die Elektrophorese erfolgte über einen Zeitraum von 2,5 h bei 40 Watt (0,8 W/cm³) in 1 x TBE-Puffer. Nach erfolgter Trennung der cDNA-Fragmente wurde das Gel auf Filterpapier (Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Nach Trocknung des Gels bei 50°C wurde ein Röntgenfilm aufgelegt. cDNA-
- 25 Banden, die im Autoradiogramm nur bei den Proben 11 und 11' auftraten, wurden mittels eines Skalpell aus dem trockenen Gel herausgeschnitten und die DNA durch Kochen in 100 µl 1 x TE-Puffer eluiert. Die mit Ethanol gefällte DNA wurde für die weiteren Untersuchungen in 10 µl Wasser resuspendiert. Nach Reamplifikation
- 30 mit den für diesen Ansatz zuvor verwendeten "Primern" konnte die DNA kloniert und sequenziert sowie auch als Sonde für Northern-Blot-Hybridisierungen eingesetzt werden.

Um zu prüfen, ob das entsprechende cDNA-Fragment tatsächlich ein

35 seneszenzspezifisch auftretendes Transkript repräsentiert, erfolgten Hybridisierungen mit RNA aus Blättern verschiedener Entwicklungsstadien:

- A. 1. RNA aus Primärblättern von 9 Tage im L/D-Wechsel
- 40 angezogenen Pflanzen
- A. 3. RNA aus Primärblättern von 10 Tage alten Pflanzen, bei deren Anzucht am Tag 10 die Lichtphase ausfiel
- 45 A. 4 RNA aus Primärblättern von 11 Tage alten Pflanzen, die am Tag 10 und 11 keine Lichtphase mehr hatten

20

- A. 5 RNA aus Primärblättern von 12 Tage alten Pflanzen, die nach 2 Tagen Dunkelheit wieder eine Lichtphase erfahren haben
- 5 Die Proben für die RNA-Analyse wurden jeweils in der Mitte der ursprünglichen Nachtphase geerntet.
- B. RNA aus Fahnenblättern, die zu sieben verschiedenen Zeitpunkten im Freiland gesammelt wurden (Abb. 6). Die Blätter waren am 29. Mai voll ausgewachsen und wiesen am 21. Juni weniger als 10 % des ursprünglichen Chlorophyllgehalts auf. Der Beginn der Seneszenzprozesse ist in Abbildung 6 durch einen Pfeil angegeben (d.h. 17 Tage nach Erreichen der vollen Länge am 15. Juni). Als Seneszenzbeginn wurde der Tag definiert, an dem die Photosystem II-Effizienz abnahm (Humbeck et al., Plant Cell Environment (1996) 19: 337 - 344).
- 10 Zur Hybridisierung eines Filters mit den beschriebenen RNA-Proben wurde neben der HPPD-Sonde zum Vergleich auch eine spezifische Sonde für das *rbcS*-Gen, das für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase kodiert, eingesetzt. Abbildung 6 zeigt die Hybridisierung der "Northern-Blots" A und B mit der cDNA HvSD36 und einer für das *rbcS*-Gen spezifischen Sonde.
- 15 Filter A trägt RNA aus Primärblättern der Gerste nach 9 Tagen Anzucht im L/D-Wechsel (9), nach anschließender ein- bzw. zeltägiger Dunkelinkubation (10, 11) und nach daran anschließender erneuter Belichtung für einen Tag (12). Filter B enthält RNA aus Fahnenblättern, die 1992 im Zeitraum vom 29.05. bis 21.06. im Freiland geerntet wurden. Der Pfeil gibt den Beginn der Sequenz am 15.06. an. Wie aus der Abbildung 6 ersichtlich, ist die Menge an *rbcS*-spezifischer mRNA dann hoch, wenn die Menge an der für die HPPD spezifischen mRNA relativ gering ist. Die für die HPPD spezifische mRNA ist in Primärblättern neun Tage alter Pflanzen vor dem Transfer ins Dunkel nicht nachweisbar und akkumuliert deutlich während der Dunkelphase. Bei Wiederbelichtung der Pflanzen nimmt die Menge an dieser mRNA deutlich ab. Im Fall der Fahnenblätter sind bereits in voll ausgewachsenen, nicht seneszenten Blättern geringe Mengen der für die HPPD spezifischen mRNA nachweisbar. Zu einer verstärkten Expression kommt es bereits 4 Tage vor dem eigentlichen Seneszenzbeginn. Die höchste Menge dieser mRNA liegt in seneszenten Blättern vor. Ein Größenvergleich mit bekannten RNA-Spezies ergab, daß das mit der cDNA-Sonde HvSD36 (S: Seneszenz; D:Dunkel, Fragmentnummer 36 im DDRT-Gel) detek-
- 45 tierte Transkript eine Länge von ca. 1,6 kb aufweist.

21

- Durch DDRT-PCR wurden unabhängig voneinander drei cDNA-Fragmente erhalten, die dieses Expressionsmuster ergaben und aufgrund der Sequenzanalyse tatsächlich dasselbe Transkript repräsentieren. Das längste Fragment hatte eine Größe von 230 bp. Das 230 bp große PCR-Produkt wurde schließlich mit dem "Sure Clone™ Ligation Kit" (Pharmacia, Freiburg) nach den Angaben des Herstellers in die SmaI-Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert. Das rekombinante Plasmid wurde in kompetente Zellen des E. coli-Stamms DH5 α transformiert. Da das Fragment, methodisch bedingt, das 3'-Ende des zugehörigen Transkripts repräsentiert, reichte die Sequenzinformation zunächst nicht aus, um eine eindeutige Homologie mit einer Sequenz in den Datenbanken ausfindig zu machen. Um eine längere zugehörige cDNA zu isolieren, wurde eine Lambda ZAPII-Bank (Stratagene, Heidelberg) aus RNA seneszenten Fahnenblätter unter Verwendung des 230 bp großen Fragments als Sonde durchmustert. Für diesen Arbeitsschritt erfolgte eine Markierung der Sonde mit Dig-dUTP nach Angaben des "DNA-Labeling and Detection Kit" (Boehringer, Mannheim). Die Untersuchung der Bank erfolgte nach dem Protokoll des "ZAP-cDNA Synthesis Kit" (Stratagene, Heidelberg).

- Im Fall der hier beschriebenen Sonde wurden 150.000 pfu überprüft. Davon gaben 39 Phagenplaques ein positives Signal. Davon wurden 12 Phagenpopulationen weiter bearbeitet. Nach einer Phagenpräparation konnten die inserierten Fragmente über PCR angereichert und elektrophoretisch aufgetrennt werden. Durch Southern-Blot Hybridisierung mit der HvSD36-Sonde wurden aus den so behandelten 12 Phagenpopulationen diejenigen ausgewählt, die die größten "Inserts" mit positivem Signal aufwiesen. Nach erneutem Ausplattieren wurden die Phagen einer weiteren Hybridisierung unterzogen. Vereinzelte Phagenplaques wurden ausgestochen und nach Elution unter Verwendung eines Helferphagen einer *In vivo* Excision nach dem Protokoll von Stratagene (Exassist™ Interference-Resistant Helper Phage with SOLR™ Strain) unterzogen. Die aus dieser Behandlung hervorgehenden sogenannten "Phagemide" enthalten die im pBLueskript (SK-) klonierte cDNA.

- Nach einer anschließenden Plasmidpräparation konnte das betreffende "Insert" mit EcoRI aus dem Bluescript-Plasmid herausgeschnitten werden. Der im Fall der HvSD36 cDNA erhaltene cDNA-Klon enthält ein "Insert" mit einer Größe von ca. 800 bp. Die vollständige Sequenzierung der cDNA erfolgte mit dem "SequiTherm Excel Long-Read DNA-Sequenzierungs-Kit" (Epicentre Technologies, Biozym Diagnostic, Oldendorf) unter Verwendung von mit IRD41 markierten Universal-"Primern", die an Sequenzbereiche im Bluescript-Vektor binden. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte über den Infrarotlaser des automatischen Sequenzierers 4000L.

22

der Firma Licor. Nach Sequenzierung lag eine genau 759 bp lange Sequenz vor, die an den Seiten von einer jeweils 14 bp langen Adaptorsequenz flankiert ist. Diese Adaptorsequenzen dienten bei der Herstellung der cDNA-Bank zur Ligation der cDNA-Fragmente mit 5 den Armen des Phagen Lambda ZAPII (Stratagene, Heidelberg).

Die Proteinsequenz HvSD36, die insgesamt über 180 Aminosäuren verfügt, weist unter den in den Datenbanken befindlichen Sequenzen mit 41 % die höchste Homologie zur Sequenz der HPPD des Menschen auf. In Anbetracht der Länge des im "Northern-Blot" 10 detektierten Transkripts (ca. 1600 nt) ist anzunehmen, daß von der cDNA noch 850-900 bp fehlen.

Zur Vervollständigung der cDNA wurde eine weitere cDNA Bank untersucht. Aus dem basalen meristematischen Bereich 5 Tage alter 15 Gerstenkeimlinge wurde mit Hilfe von "Dynabeads" (Dynal, Hamburg) mRNA isoliert und mit dem "Time Saver cDNA SyntheseKit" (Pharmacia, Freiburg) in cDNA überschrieben. Es folgte eine Ligation von EcoRI/NotI-Adaptoren (Pharmacia, Freiburg) an die cDNA mit 20 anschließender Ligation in den Lambda ExCell Vektor (Pharmacia, Freiburg). Schließlich wurde die rekombinante Phagen-DNA mit Hilfe des "Gigapack II Gold Set" (Stratagene, Heidelberg) in Phagenproteine verpackt. Mit der 759 bp langen Sonde HvSD36 wurden 400000 pfu überprüft, wobei 5 Phagen von der Sonde 25 detektiert wurden. Eine Excision der "Phagemids" aus dem Phagen erfolgte *in vivo* mit Hilfe des Bakterienstammes NP66 nach den Angaben von Pharmacia (Freiburg). Aus einzelnen Bakterienkolonien wurden die rekombinanten pExCell-Plasmide isoliert und zur Vermehrung in den Bakterienstamm D115 α überführt.

30 Der längste auf diesem Weg isolierte cDNA-Klon HvSD36 hat eine Länge von 1565 bp und wurde vollständig sequenziert (siehe Sequenzprotokoll).

35 Beispiel 2

Charakterisierung der genomischen Sequenz

Zur Auffindung eines genomischen Klonen, der die Gensequenz der 40 HPPD beinhaltet, wurde eine Lambda FIXII-Bank der Gerste von der Firma Stratagene (Heidelberg) bezogen. Zur Herstellung der Bank diente DNA aus etioliierten Blättern der Wintergerste cv. Igri. Die DNA wurde partiell mit Sau3AI verdaut. Vor der Klonierung in die XhoI-Schnittstelle des Vektors erfolgte eine Auffüllung der 45 Fragmentenden und der Phagenarme mit Nukleotiden. Die Durchmusterung der Bank mit 200.000 pfu in der ersten Runde ergab nur einen Klon, der mit der cDNA HvSD36 hybridisierte. Nach

23

Restriktionsverdau dieses rekombinanten Phagen mit PstI und SacI konnten anschließend Fragmente mit Größen von 5400, 3800 und 1800 bp isoliert werden, die bei einer "Southern"-Blot-Hybridisierung mit der HvSD36-Sonde detektierbar sind. Diese Subfragmente liegen kloniert im Bluescript-Vektor vor.

Die Durchmusterung der Bank erfolgte nach der für die HybondN-Membran angegebenen Vorschrift. Die Markierung der Sonde für die Durchmusterung der Bank sowie für "Southern"-Blot-Hybridisierung erfolgte über "Random Priming" mit ^{32}P -dATP unter Verwendung des Klenow-Enzyms (Sambrook et al., (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

Es wurde ein genomischer "Southern-Blot" mit gesamter DNA aus Gerste (Carina) durchgeführt (Abb. 7). Je 15 µg DNA wurden mit BamHI (B), EcoRI (E), HindIII (H) oder XbaI (X) verdaut und in einem 0.75 % Agarose Gel aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Hybond N+ Membran (Amersham, Braunschweig) erfolgte eine Hybridisierung mit der unvollständigen 759bp langen cDNA Sonde von HvSD36 nach Angaben des Herstellers der Membran. Dabei konnten folgende Fragmente detektiert werden:

BamHI: 6.0, 3.9 und 3.0 kbp
 EcoRI: >10kbp
 HindIII: 8.3, 2.6, 1.1 und 1.0 kbp
 XbaI: 9.0, 5.2 und 4.2kbp

Die Längen der Fragmente wurden durch Vergleich mit einem DNA-Größenstandard (Kb-Leiter von GibcoBRL, Eggenstein) abgeschätzt.

Beispiel 3

Homologievergleich der Proteinsequenz von HvSD36

Ein Vergleich der Proteinsequenz von HvSD36 mit Proteinsequenzen in den Datenbank ergab Homologien zu folgenden bisher bekannten Proteinsequenzen:

	10	20	30	40	50
40 HPPD_HvMP	PTPTTPAATG
HPPD_AthMGHQNA	VSENQNHDDG
HPPD_HUMAN
HPPD_RAT
HPPD_PIG
45 HPPD_MOUSE
HPPD_PSESP
MELA_SHECO
PEA3_MOUSE	MTKSSNHNCL	LRPENKPLW	GPGAQAASLR	PSPATLVVSS	PGHAEHPPAA

24

	60	70	80	90	100
HPPD_Hv	AAAAVTPEHA	RPHRMVRFNP	RSDRFHTLSF	HHVEFWCADA	ASAAGRFAFA
HPPD_Ath	AASSPGFKLV	GFSKFVRKNP	KSDKFKVKRF	HHIEFWCGDA	TNVARRFSWG
HPPD_HUMAN	M	TTYSDKGAKP	ERGRFLH--F	HSVTFWVGNA	KQAASFYCSK
HPPD_RAT		YWDKGPKP	ERGRFLH--F	HSVTFWVGNA	KQAASFYCNK
5 HPPD_PIG	M	TSYSDKGKPK	ERGRFLH--F	HSVTFWVGNA	KQAASFYCSK
HPPD_MOUSE	M	TTYNNKGPKP	ERGRFLH--F	HSVTFWVGNA	KQAASFYCNK
HPPD_PSESP			ADLYENP	MGLMGPEFIE	LASPTPNTLE
MELA_SHECO			MASEQNP	LGLLGIEFTE	FATPDLDPMH
PEA3_MOUSE	PAQTPGPQVS	ASARGPGPVA	GGSGRMERRM	KGGYL---DQ	RVPTYFCSSK
	110	120	130	140	150
10 HPPD_Hv	LGAPLAARSD	LSTGNSAHAS	QLLRSGSLAF	LFT--APYAN	G-CDAA----
HPPD_Ath	LGMRFSAKSD	LSTGNMVAS	YLLTSGDLRF	LFT--APYSP	S-LSAGEIKP
HPPD_HUMAN	MGFEPLAYRG	LETGSREVVS	HVIKQKIVF	VLS--SA---	-----LNP
HPPD_RAT	MGFEPLAYKG	LETGSREVVS	HVIKQKIVF	VLC--SA---	-----LNP
HPPD_PIG	IGFEPLAYKG	LETGSREVVS	HVVKQDKIVF	VFS--SA---	-----LNP
HPPD_MOUSE	MGFEPLAYRG	LETGSREVVS	HVIKRGKIVF	VLC--SA---	-----LNP
15 HPPD_PSESP	PIFEIMGFTK	VATHRSKDV-	HLVRQAINL	ILN--NE---	-----
MELA_SHECO	KVFIDFGFSK	LKKHKQKDI-	VYYKQNDINF	LLN--NE---	-----
PEA3_MOUSE	PGNGSLGEAL	MVPQKLMDB	GSLPPSDSED	LFQDLSHFQE	TWLAEAQVPD
	160	170	180	190	200
HPPD_Hv	--TASLPSPS	ADAARRFSAD	HGIAVRSVAL	RVADAAEAFR	ASRRRGARPA
HPPD_Ath	TTTASIPSPD	HGSCRSFFSS	HGLGVRVAI	EVEDAESAFS	ISVANGAIPS
20 HPPD_HUMAN	-----WN	KEMGDHL-VK	HGDGVKDIAF	EVEDCDYIVQ	KARERGAkim
HPPD_RAT	-----WN	KEMGDHL-VK	HGDGVKDIAF	EVEDCEHIVQ	KARERGAkiv
HPPD_PIG	-----WN	KEMGDHL-VK	HGDGVKDIAF	EVEDCDYIVQ	KARERGAiiv
HPPD_MOUSE	-----WN	KEMGDHL-VK	HGDGVKDIAF	EVEDCDHIVQ	KARERGAkiv
HPPD_PSESP	-----P	HSVASYPAAE	HGPSVCGMAF	RVKDSQKAYK	RALELGAQPI
MELA_SHECO	-----K	QGFSAQFAKT	HGPAISSMGW	RVEDANFAFE	GAVARGAKPA
25 PEA3_MOUSE	SDEQFVPDFH	---SENLAFFH	SPTRIKKEP	QSPRTDPALS	CSRPPLPYH
	210	220	230	240	250
HPPD_Hv	FAPV-----	-----DLGRG	FAPAEVELYG	--DVVLRFVS	HP--DG--TD
HPPD_Ath	SPPI-----	-----VLNEA	VTIAEVKLYG	--DVVLRYVS	YKAEDT--EK
HPPD_HUMAN	REP-----	-WVEQDKFGK	VKFAVLQTYG	--DTHTLVE	KMN-----YI
HPPD_RAT	REP-----	-WVEEDKFGK	VKFAVLQTYG	--DTHTLVE	KIN-----YT
30 HPPD_PIG	REEVC-CAAD	VRGHHTPLDR	AR----QVWE	--GT---LVE	KMT-----FC
HPPD_MOUSE	REP-----	-WVEQDKFGK	VKFAVLQTYG	--DTHTLVE	KIN-----YT
HPPD_PSESP	HI-----	-----ETGPME	LNLPAIKGIG	--GAPLYLID	RFGESSSIYD
MELA_SHECO	AD-----	-----EV--KD	LPYPAIYGIG	--DSLIFYID	TFGDDNNIYT
PEA3_MOUSE	HGEQCLYSRQ	IAIKSPAPGA	PGQSPLQPPS	RAEQQSLLR	ASSSSQSHPG
	260	270	280	290	300
35 HPPD_Hv	VPFLPGFEGV	TNPDA-----	VDYGLTRFDH	VVGNVP--EL	-APAAAYIAG
HPPD_Ath	SEFLPGFERV	EDASSF---P	LDYGIRRLDH	AVGNVP--EL	-GPALTYVAG
HPPD_HUMAN	GQFLPGYEAP	AFMDPLLPLK	PKCSLEMIDH	IVGNQPDQEM	-VSASEW---
HPPD_RAT	GRFLPGFEAP	TYKDTLLPKL	PSCNLEIIDH	IVGNQPDQEM	-ESASEW---
HPPD_PIG	LDSRPQPSQT	LLHRLLSKL	PKCGLEIIDH	IVGNQPDQEM	-ESASQW---
HPPD_MOUSE	GRFLPGFEAP	TYKDTLLPKL	PRCNLEIIDH	IVGNQPDQEM	-QSASEW---
40 HPPD_PSESP	IDFV--FLEG	VDRHPVGA--	---GLKIIDH	LTHNVYGRM	-A---YWANF
MELA_SHECO	SDF-----EA	LDEPIITQ--	-EKGFIEVDH	LTNNVHKGTM	-E---YWSNF
PEA3_MOUSE	HGYLGEHSSV	FQQPVMCHS	FTSPQGGGRE	PLPAPYQHQL	SEPCPPYPQO
	310	320	330	340	350
HPPD_Hv	FT---GFHEF	AEFTAEDVGT	TESGLNSVVL	ANNSEGVLLP	LNEPVHGTRK
45 HPPD_Ath	FT---GFHQF	AEFTAEDVGT	AESGLNSAVL	ASNDENVLLP	INEPVHGTRK
HPPD_HUMAN	YLKNLQPHRF	WSVDDTQVHT	EYSSLSRIVV	ANYEESIKMP	INEPAPG-KK
HPPD_RAT	YLKNLQPHRF	WSVDDTQVHT	EYSSLSRIVV	ANYEESIKMP	INEPAPG-RK
HPPD_PIG	YMRNLQPHRF	WSVDDTQIHT	EYSALRSVVM	ANYEESIKMP	INEPAPG-KK

25

HPPD_MOUSE	YLKNLQFHRF	WSVDDTQVHT	EYSSLRSIVV	TNYEESIKMP	INEPAPG-RK
HPPD_PSESP	YEKLFNFREI	RYF---DIKG	EYTGLTSKAM	TAPDGMIRIP	LINE--ESSKG
MELA_SHECO	YKDIFGFTEV	RYF---DIKG	SQTALISYAL	RSPDGSFCIP	INE--GKGDD
PEA3_MOUSE	NFKQ-EYHDP	LYEQAGQPAS	SQGGVSGHRY	PGAGVVIKQE	RTDFAYDSDV
5	360	370	380	390	400
HPPD_Hv	RSQIQTFLEH	HGGPGVQH-I	AVASSDVLRT	LKMRARSAM	GGFDLPPPL
HPPD_Ath	KSQIQTYLEH	NEGAGLQH-L	ALMSDIFRT	LREMRKRSSI	GGFDFMPSP
HPPD_HUMAN	KSQIQEYVDY	NGGAGVQH-I	ALKTEDIITA	IRHLRER---	-GLEFLSVP-
HPPD_RAT	KSQIQEYVDY	NGGAGVQH-I	ALRTEDIITT	IRHLRER---	-GMEFLAVP-
HPPD_PIG	KSQIQEYVDY	NGGAGVQH-I	ALKTEDIITA	IRSLRER---	-GVEFLAVP-
HPPD_MOUSE	KSQIQEYVDY	NGGAGVQH-I	ALKTEDIITA	IRHLRER---	-GTEFLAAP-
10	HPPD_PSESP	AGQIEEFLMQ	FNGEGIQH-V	AFLSDDLKT	WDHLKSI---
MELA_SHECO	RNQIDEYLKE	YDGPVQH-L	AFRSRDIVAS	LDAMEGS---	-SIQTLDIIP
PEA3_MOUSE	PGCASMYLHP	EGFSGPSPGD	GVMGYGYEKS	LRPPDDVCI	VPKKFEQDIK
	410	420	430	440	450
HPPD_Hv	PKYYEGVRL	AGD--VLSEA	QIKECQELGV	LVDRDDQG--	--VLL-----
15	HPPD_Ath	PTYYQNLKKR	VGD--VLSD	QIKECEELGI	LVDRDDQG--
HPPD_HUMAN	STYYKQLREK	LKTAKIKVKE	NIDALEELKI	LVDYDEKG--	--YLL-----
HPPD_RAT	SSYYRLLREN	LKTSKIQVKE	NMDVLEELKI	LVDYDEKG--	--YLL-----
HPPD_PIG	FTYYKQLQEK	LKSAKIRVKE	SIDVLEELKI	LVDYDEKG--	--YLL-----
HPPD_MOUSE	SSYYKLLREN	LKSAKIQVKE	SMDVLEELHI	LVDYDEKG--	--YLL-----
HPPD_PSESP	DTYYEMLEGR	LPN----HGE	PVGELQARGI	LLDGSSSESGD	KRLLL-----
MELA_SHECO	E-YYDTIFEK	LPQ----VTE	DRDRIKHQI	LVDGDEDG--	--YLL-----
20	PEA3_MOUSE	QEGIGAFREG	PPYQR-----	-RGALQLWQF	LVALLDPTN
	460	470	480	490	500
HPPD_Hv	QIFTKPVGDR	PTLFLEMIQR	IGCMKDERG	EE----YQKG	GCGGFGKGNF
HPPD_Ath	QIFTKPLGDR	PTIFIEIIQR	VGCMKDEEG	KA----YQSG	GCGGFGKGNF
HPPD_HUMAN	QIFTKPVQDR	PTLFLEVIQR	HNHQ-----	-----	---GFGAGNF
25	HPPD_RAT	QIFTKPMQDR	PTLFLEVIQR	HNHQ-----	-----
HPPD_PIG	QIFTKPMQDR	PTVFLEVIQR	NNHQ-----	-----	---GFGAGNF
HPPD_MOUSE	QIFTKPMQDR	PTLFLEVIQR	NNHQ-----	-----	---GFGAGNF
HPPD_PSESP	QIFSETLMGP	--VFFEFIQR	-----KGDD-	-----	---GFGEGNF
MELA_SHECO	QIFTKNLFGP	--IFIEIIQR	-----KNNL-	-----	---GFGEGNF
PEA3_MOUSE	MEFKLIEPEE	VARLWGIQKN	RPAMNYDKLS	RSLRYYYEKG	IMQKVAGERY
30	510	520	530	540	550
HPPD_Hv	-----SE	LFK-SIE-DY	--EKS--LEA	KQSAAV-QGS	
HPPD_Ath	-----SE	LFK-SIE-EY	--EKT--LEA	KQLVG	
HPPD_HUMAN	-----NS	LFK-AFEEEQ	--NLRGNLTN	METNGVVPGM	
HPPD_RAT	-----NS	LFK-AFEEEQ	--ALRG		
HPPD_PIG	-----NS	LFK-AFEEEQ	--ELRGNLTD	TDPNGVPFRL	
35	HPPD_MOUSE	-----NS	LFK-AFEEEQ	--ALRGNLTD	LEPNGVRSKM
HPPD_PSESP	-----KA	LFE-SIERDQ	--VRRGVLST	-D	
MELA_SHECO	-----KA	LFE-SIERDQ	--VRRGVL		
PEA3_MOUSE	VYKFVCEPEA	LFSLAFPDNQ	RPALKAEDR	PVSEEDTVPL	SHLDESPAYL
	560	570			
40	HPPD_Hv				
HPPD_Ath					
HPPD_HUMAN					
HPPD_RAT					
HPPD_PIG					
HPPD_MOUSE					
HPPD_PSESP					
45	MELA_SHECO				
PEA3_MOUSE	PELTGPAPPF	GHRGGYSY			

26

- Erläuterung: HPPD_Hv: *Hordeum vulgare* 4-hydroxyphenylpyruvate
dioxxygenase (HvSD36)
HPPD_Ath: *Arabidopsis thaliana* 4-hydroxyphenylpy-
ruvate dioxxygenase
5 HPPD_HUMAN: *H.sapiens* 4-hydroxyphenylpyruvate
dioxxygenase
HPPD_PIG: Pig 4-hydroxyphenylpyruvate dioxxygenase
HPPD_RAT: Rat F alloantigen
HPPD_MOUSE: Mouse 4-hydroxyphenylpyruvate dioxy-
10 genase
MELA_SHECO: *S. colwelliana* mela protein
HPPD_PSESP: *Pseudomonas* sp. (strain P.J.874)
4-hydroxyphenylpyruvate dioxxygenase
PEA3_MOUSE: *Mus musculus* (mouse) PEA3 polypeptide
15
- Die größte Homologie wurde zu der Arabidopsis Sequenz
gefunden mit 58 % über die gesamte Sequenz (62 % über 412
As), gefolgt von HPPD_RAT mit 35 % (über 365 As),
HPPD_HUMAN 34 % (über 365 AS), HPPD_MOUSE 34 % (über 371
20 As).

Beispiel 4

Anzucht von Gerste (*Hordeum vulgare*)

- 25 Gerstensetzlinge (*Hordeum vulgare* L., cv. Carina, Ackermann Saat-
zucht, Irbach, Germany) wurden über einen Zeitraum von 15 Tagen
unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer in sogenann-
ten Mitscherlich-Töpfen in Erde, die 4 g pro Liter Osmocote 5M
(Urania, Hamburg, Germany) enthielt, angezogen. Um einheitliches
30 Wachstum sicherzustellen, wurden die Samen auf feuchtem Filterpa-
pier im Dunkeln für 2 Tage bei 4°C und 1 Tag bei 21°C ausgekeimt
und nur solche Setzlinge eingesetzt, die gleiches Längenwachstum
der Primärwurzel zeigten. Nach dem Transfer dieser Setzlinge auf
Erde wurden diese mit 1.5 cm gesiebter Erde bedeckt. Danach wur-
35 den die Pflanzen über 9 Tage bei 16 Stunden Licht ($120 \mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
und 8 Stunden Dunkelheit verbunden mit einem Temperaturschift
(21°C bei Tag, 16°C bei Nacht) inkubiert. Um Seneszenz zu induzie-
ren, werden die Pflanzen nach 9 Tagen für 2 Tage (Tag 10 und 11)
im Dunkeln bei der obengenannten Temperatur gehalten.

40

Beispiel 5

Anzucht von Tabak

- Die Tabakpflanzen wurden nach bekannter Methode angezogen. Die
45 verwendete Tabaksorte ist *Nicotiana tabacum*, cv. Xanthi.

27

Beispiel 6

Transformation von Tabak

Die erfindungsgemäße Expressionskassette enthaltend das HPPD-Gen
5 mit der Sequenz 1 wurde in den Vektor pBinAR-Hyg kloniert
(Abb. 4). Mit diesem Vektor wurden Tabakpflanzen gemäß Beispiel 5
anschließend nach bekannter Methode transformiert.

Beispiel 7

10 Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Tabak

Die cDNA der HPPD wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und
in Tabak unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert.
Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolin-
15 genes verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Tabaksamen
zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte
Tabakpflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend
wurde der α -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen
der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α -Tocopherol-
20 konzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze
erhöht.

25

30

35

40

45

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF AG
- (B) STRASSE: Carl Bosch
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (D) BUNDESLAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 67056
- (G) TELEPHON: 0621-60-52698

(ii) ANMELDETITEL: HPPD Sequenz aus Gerste

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1565 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: hppd aus Gerste
- (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: senescence

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: lambda FIXII-Bank der Gerste
- (B) CLON: pHvSD36.seq

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 9..1313

(x) VERÖFFENTLICHUNGSMITTELMATERIAL:

- (A) AUTORS: Krupinska, Karin
- (B) TITEL: Overexpression of HPPD
- (C) ZEITSCHRIFT: overexpression of HPPD

29

(G) DATUM: 1998

(K) BELANGREICHE RESTE IN SEQ ID NO: 1: VON 1 BIS 1565

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGCACACC ATG CCG CCC ACC CCC ACC ACC CCC GCG GCT ACC GGC GCC GCC	50
Met Pro Pro Thr Pro Thr Thr Pro Ala Ala Thr Gly Ala Ala	
1 5 10	
GCC GCG GTG ACG CCG GAG CAC GCG CGA CCG CAC CGA ATG GTC CGC TTC	98
Ala Ala Val Thr Pro Glu His Ala Arg Pro His Arg Met Val Arg Phe	
15 20 25 30	
AAC CCG CGC AGC GAC CGC TTC CAC ACG CTC TCC TTC CAC CAC GTC GAG	146
Asn Pro Arg Ser Asp Arg Phe His Thr Leu Ser Phe His His Val Glu	
35 40 45	
TTC TGG TGC GCG GAC GCC GCC TCC GCC GCC GGC CGC TTC GCG TTC GCG	194
Phe Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ala Phe Ala	
50 55 60	
CTC GGC GCG CCG CTC GCC GCC AGG TCC GAC CTC TCC ACG GGG AAC TCC	242
Leu Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser	
65 70 75	
GCG CAC GCC TCC CAG CTG CTC CGC TCG GGC TCC CTC GCC TTC CTC TTC	290
Ala His Ala Ser Gln Leu Leu Arg Ser Gly Ser Leu Ala Phe Leu Phe	
80 85 90	
ACC GCG CCC TAC GCC AAC GGC TGC GAC GCC GCC ACC GCC TCC CTG CCC	338
Thr Ala Pro Tyr Ala Asn Gly Cys Asp Ala Ala Thr Ala Ser Leu Pro	
95 100 105 110	
TCC TTC TCC GCC GAC GCC GCG CGC CGG TTC TCC GCC GAC CAC GGG ATC	386
Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Arg Phe Ser Ala Asp His Gly Ile	
115 120 125	
GCG GTG CGC TCC GTA GCG CTG CGC GTC GCA GAC GCC GCC GAG GCC TTC	434
Ala Val Arg Ser Val Ala Leu Arg Val Ala Asp Ala Ala Glu Ala Phe	
130 135 140	
CGC GCC AGT CGT CGA CGG GGC GCG CGC CCG GCC TTC GCC CCC GTG GAC	482
Arg Ala Ser Arg Arg Arg Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala Pro Val Asp	
145 150 155	
CTC GGC CGC GGC TTC GCG TTC GCG GAG GTC GAG CTC TAC GGC GAC GTC	530
Leu Gly Arg Gly Phe Ala Phe Ala Glu Val Glu Leu Tyr Gly Asp Val	
160 165 170	
GTG CTC CGC TTC GTC AGC CAC CCG GAC GGC ACG GAC GTG CCC TTC TTG	578
Val Leu Arg Phe Val Ser His Pro Asp Gly Thr Asp Val Pro Phe Leu	
175 180 185 190	

30

CCG GGG TTC GAG GGC GTA ACC AAC CCG GAC GCC GTG GAC TAC GGC CTG	626
Pro Gly Phe Glu Gly Val Thr Asn Pro Asp Ala Val Asp Tyr Gly Leu	
195 200 205	
ACG CGG TTC GAC CAC GTC GTC GGC AAC GTC CCG GAG CTT GCC CCC GCC	674
Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Ala Pro Ala	
210 215 220	
GCA GCC TAC ATC GCC GGG TTC ACG GGG TTC CAC GAG TTC GCC GAG TTC	722
Ala Ala Tyr Ile Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe	
225 230 235	
ACG GCG GAG GAC GTG GGC ACG ACC GAG AGC GGG CTC AAC TCG GTG GTG	770
Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn Ser Val Val	
240 245 250	
CTC GCC AAC AAC TCG GAG GGC GTG CTG CTG CCG CTC AAC GAG CCG GTG	818
Leu Ala Asn Asn Ser Glu Gly Val Leu Leu Pro Leu Asn Glu Pro Val	
255 260 265 270	
CAC GGC ACC AAG CGC CGG AGC CAG ATA CAG ACG TTC CTG GAA CAC CAC	866
His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Phe Leu Glu His His	
275 280 285	
GGC GGC CCG GGC GTG CAG CAC ATC GCG GTG GCC AGC AGT GAC GTG CTC	914
Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Val Ala Ser Ser Asp Val Leu	
290 295 300	
AGG ACG CTC AGG AAG ATG CGT GCG CGC TCC GCC ATG GGC GGC TTC GAC	962
Arg Thr Leu Arg Lys Met Arg Ala Arg Ser Ala Met Gly Gly Phe Asp	
305 310 315	
TTC CTG CCA CCC CCG CTG CCG AAG TAC TAC GAA GGC GTG CGA CGC CTT	1010
Phe Leu Pro Pro Pro Leu Pro Lys Tyr Tyr Glu Gly Val Arg Arg Leu	
320 325 330	
GCC GGG GAT GTC CTC TCG GAG GCG CAG ATC AAG GAA TGC CAG GAG CTG	1058
Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys Gln Glu Leu	
335 340 345 350	
GGT GTG CTC GTC GAT AGG GAC GAC CAA GGG GTG TTG CTC CAA ATC TTC	1106
Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe	
355 360 365	
ACC AAG CCA GTA GGG GAC AGG CCG ACC TTG TTC CTG GAG ATG ATC CAG	1154
Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Leu Phe Leu Glu Met Ile Gln	
370 375 380	
AGG ATC GGG TGC ATG GAG AAG GAC GAG AGA GGG GAA GAG TAC CAG AAG	1202
Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Arg Gly Glu Glu Tyr Gln Lys	
385 390 395	

31

GGT GGC TGC GGC GGG TTC GGC AAA GGC AAC TTC TCC GAG CTG TTC AAG	1250
Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys	
400 405 410	
TCC ATT GAA GAT TAC GAG AAG TCC CTT GAA GCC AAG CAA TCT GCT GCA	1298
Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ser Ala Ala	
415 420 425 430	
GTT CAG GGA TCA TAGGATAGAA GCTGGTCCTT GTATCATGGT CTCATGGAGC	1350
Val Gln Gly Ser	
435	
AAAAGAAAAC AATGTTGTTT GTAATATGCG TCGCACAATT ATATCAATGT TATAATTGGT	1410
GAAGCTGAAG ACAGATGTAT CCTATGTATG ATGGGTGTAA TGGATGGTAG AGGGGCTCAC	1470
ACATGAAGAA AATGTAGCGT TGACATTGTT GTACAATCTT GCTTGCAAGT AAAATAAAGA	1530
ACAGATTTTG AGTTCTGCAA AAAAAAAAAA AAAAA	1565

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 434 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Pro Pro Thr Pro Thr Thr Pro Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala	15
1 5 10	
Val Thr Pro Glu His Ala Arg Pro His Arg Met Val Arg Phe Asn Pro	30
20 25	
Arg Ser Asp Arg Phe His Thr Leu Ser Phe His His Val Glu Phe Trp	45
35 40	
Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ala Phe Ala Leu Gly	60
50 55	
Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala His	80
65 70 75	
Ala Ser Gln Leu Leu Arg Ser Gly Ser Leu Ala Phe Leu Phe Thr Ala	95
85 90	
Pro Tyr Ala Asn Gly Cys Asp Ala Ala Thr Ala Ser Leu Pro Ser Phe	110
100 105	
Ser Ala Asp Ala Ala Arg Arg Phe Ser Ala Asp His Gly Ile Ala Val	125
115 120	

32

Arg Ser Val Ala Leu Arg Val Ala Asp Ala Ala Glu Ala Phe Arg Ala		
130	135	140
Ser Arg Arg Arg Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala Pro Val Asp Leu Gly		
145	150	155 160
Arg Gly Phe Ala Phe Ala Glu Val Glu Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu		
	165	170 175
Arg Phe Val Ser His Pro Asp Gly Thr Asp Val Pro Phe Leu Pro Gly		
	180	185 190
Phe Glu Gly Val Thr Asn Pro Asp Ala Val Asp Tyr Gly Leu Thr Arg		
	195	200 205
Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Ala Pro Ala Ala Ala		
	210	215 220
Tyr Ile Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Glu Phe Ala Glu Phe Thr Ala		
	225	230 235 240
Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn Ser Val Val Leu Ala		
	245	250 255
Asn Asn Ser Glu Gly Val Leu Leu Pro Leu Asn Glu Pro Val His Gly		
	260	265 270
Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Phe Leu Glu His His Gly Gly		
	275	280 285
Pro Gly Val Gln His Ile Ala Val Ala Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr		
	290	295 300
Leu Arg Lys Met Arg Ala Arg Ser Ala Met Gly Gly Phe Asp Phe Leu		
	305	310 315 320
Pro Pro Pro Leu Pro Lys Tyr Tyr Glu Gly Val Arg Arg Leu Ala Gly		
	325	330 335
Asp Val Leu Ser Glu Ala Gln Ile Lys Glu Cys Gln Glu Leu Gly Val		
	340	345 350
Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys		
	355	360 365
Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Leu Phe Leu Glu Met Ile Gln Arg Ile		
	370	375 380
Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Arg Gly Glu Glu Tyr Gln Lys Gly Gly		
	385	390 395 400
Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile		
	405	410 415

33

Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ser Ala Ala Val Gln
420 425 430

Gly Ser

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz SEQ ID NO:1 und damit hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine HPPD.
2. Expressionskassette enthaltend einen Promotor und eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1.
3. Expressionskassette nach Anspruch 2, enthaltend den CaMV35S-Promotor.
4. Expressionskassette nach Anspruch 2, enthaltend den samen-spezifischen Phaseolin-Promotor.
5. Expressionskassette nach Anspruch 2, wobei die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 funktionell mit einem anderen Protein so verknüpft ist, daß ein gemeinsames Translationsprodukt entsteht.
6. Verwendung der Expressionskassette gemäß Anspruch 2 zur Transformation von Pflanzen.
7. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette gemäß Anspruch 2 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
8. Verfahren zur Transformation von Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - 1) die Expressionskassette nach Anspruch 2 in einen Agrobakterienstamm transferiert,
 - 2) die entstandenen rekombinanten Klone isoliert und
 - 3) diese zur Transformation von Pflanzen verwendet.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Transformation mit Hilfe des Stammes *Agrobacterium tumefaciens* erfolgt.
10. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe der Elektroporation erfolgt.

(Zeichn.)

35

11. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe der particle bombardment Methode erfolgt.
- 5 12. Pflanze mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt enthaltend eine Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 2 bis 5.
13. Pflanze gemäß Anspruch 12, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.
- 10 14. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 in Pflanzen exprimiert wird.
- 15 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz in einer Tabakpflanze exprimiert wird.
16. Verfahren nach Anspruch 14 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression in den Blättern oder den Samen der Pflanze erfolgt.
- 20 17. Verwendung von Expressionskassetten gemäß den Ansprüchen 2 bis 5 zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt durch Expression einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 in Pflanzen.
- 25 18. Verwendung der Expressionskassette gemäß Anspruch 2 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der HPPD.
- 30 19. Testsystem basierend auf der Expression einer Expressionskassette gemäß Anspruch 2 zur Identifizierung von Inhibitoren der HPPD.
- 35 20. Herbizide Wirkstoffe, identifizierbar mittels eines Testsystems gemäß Anspruch 19.
21. Verwendung einer Pflanze gemäß Anspruch 12 zur Herstellung pflanzlicher HPPD.
- 40 22. Verwendung der Expressionskassette gemäß Anspruch 2 zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD durch verstärkte Expression einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1.

36

23. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD durch verstärkte Expression einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1.

5 24. Pflanze mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD
enthaltend eine Expressionskassette gemäß den Ansprüchen
2 bis 5.

10

15

20

25

30

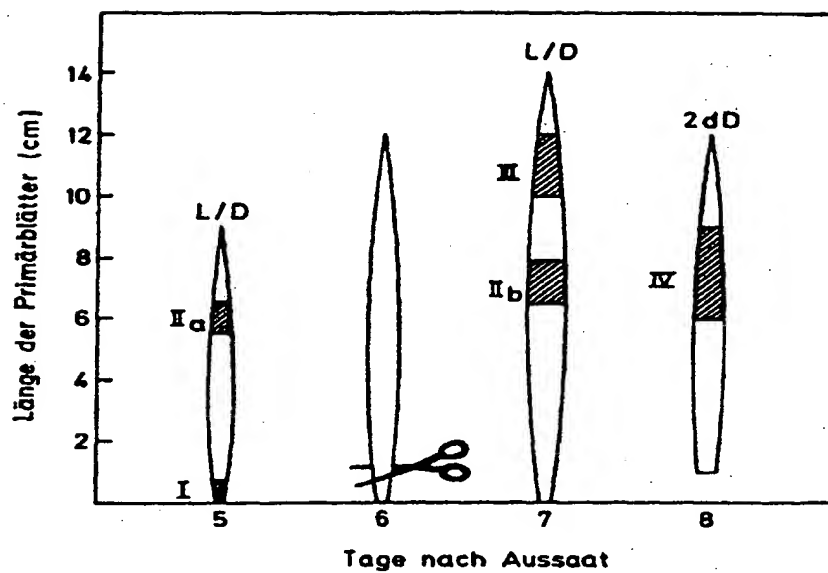
35

40

45

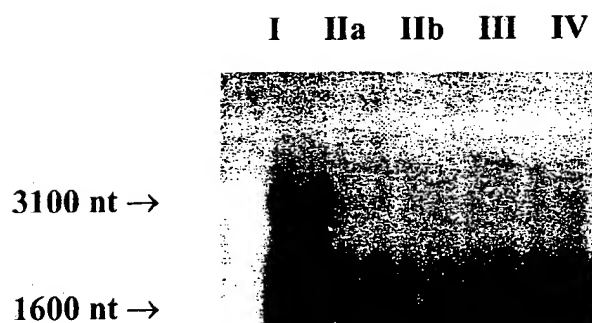
1/7

Fig. 1/7



2/7

Fig. 2/7



3/7

Fig. 3/7

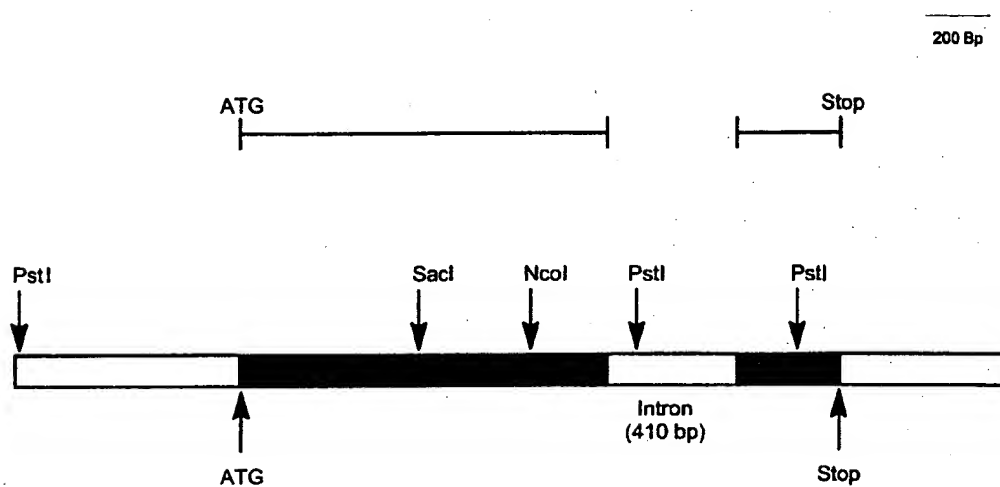


Fig. 4/7

FIG.4A

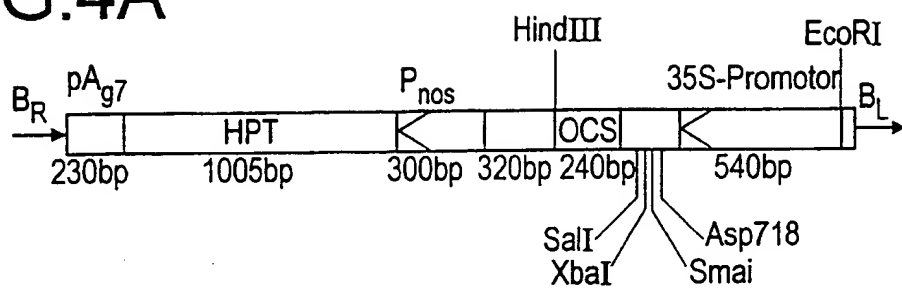
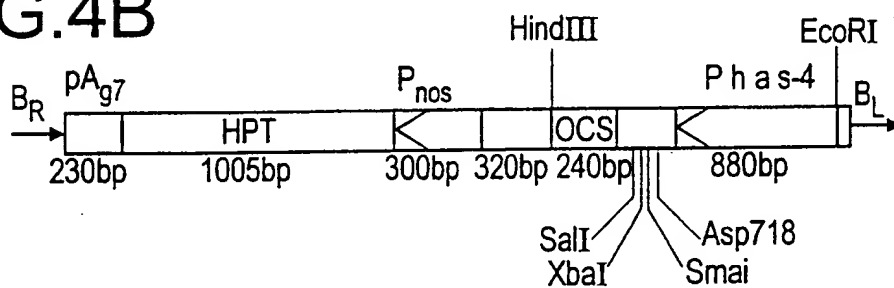


FIG.4B

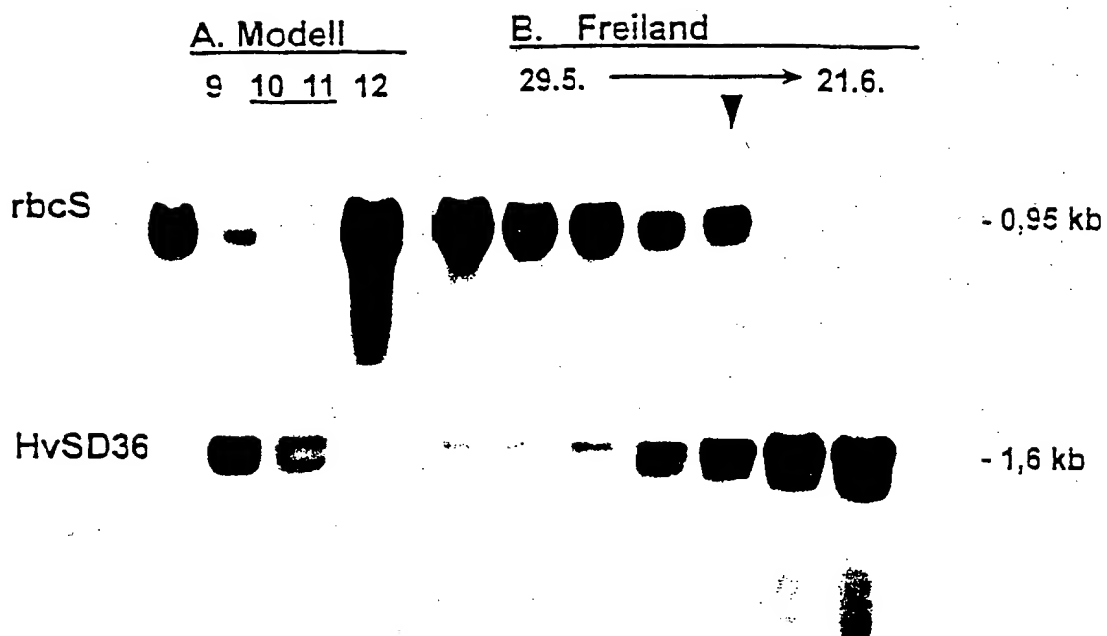


5/7

Fig. 5/7



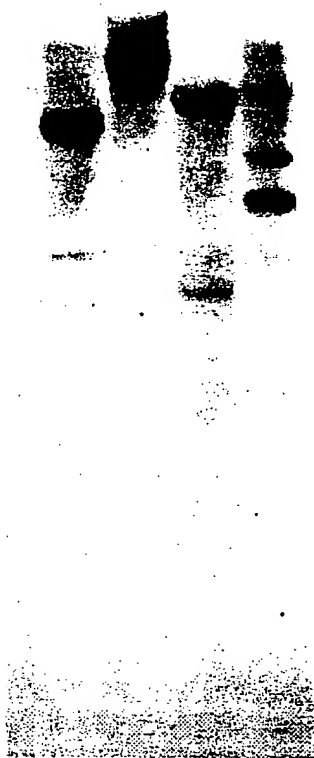
Fig. 6/7



7/7

Fig. 7/7

B E H X



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. itional Application No

PCT/EP 98/03832

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C12N15/53 C12N9/02 C12N5/10 G01N33/50
A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N G01N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 38567 A (RHONE-POULENC AGROCHIMIE ; SAILLAND ALAIN (FR); ROLLAND ANNE (FR);) 5 December 1996 cited in the application	1-3, 6-11, 22-24
Y	pages 1, 2; example	18-20
X	NORRIS, S.R., ET AL. : "arabidopsis plastoquinone and tocopherol biosynthetic mutants are also carotenoid deficient" PLANT PHYSIOLOGY, SUPPLEMENT, vol. 111, no. 2, June 1996, page 40 XP002083334	1-3, 6-12, 14, 16, 17, 21
Y	see the whole document	18-20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 November 1998

Date of mailing of the international search report

27/11/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In: itional Application No

PCT/EP 98/03832

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARTA I C ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF 4-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXEGENASE FROM MAIZE" PESTICIDE SCIENCE, vol. 48, no. 2, 1996, pages 109-116, XP000646540 pages 109, 110, left hand-column; page 115 ---	20
X	LENNE C ET AL: "LOCALIZATION AND PARTIAL PURIFICATION OF P-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE FROM CULTURED CARROT CELLS" PHOTOSYNTHESIS: FROM LIGHT TO BIOSPHERE. PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL PHOTOSYNTHESIS CONGRESS, vol. 5, 20 August 1995, pages 285-288, XP000646348 see page 288 ---	1
Y	"LARGE SCALE TESTING OF 4-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXUGENASE FOR THE DETECTION OF NEW HERBICIDAL LEADS" RESEARCH DISCLOSURE, no. 393, January 1997, page 73 XP000693711 see the whole document ---	18-20
A	NORRIS S R ET AL: "GENETIC DISSECTION OF CAROTENOID SYNTHESIS IN ARABIDOPSIS DEFINES PLASTOQUINONE AS AN ESSENTIAL COMPONENT OF PHYTOENE DESATURATION" PLANT CELL, vol. 7, December 1995, pages 2139-2149, XP002041909 abstract, page 2140, left hand column; page 2141, right hand column; pages 2142, 2143; figures 3, 4, 7 ---	1-24
P,X	KLEBER-JANKE, T. AND KRUPINSKA, K.: "isolation of cDNA clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced senescence as well as during senescence under field conditions" PLANTA, vol. 203, November 1997, pages 332-340, XP002083335 abstract, page 337,; page 339, figures 2, 4; table 2 ---	1
P,X	WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA) 31 July 1997 pages 4, 6, 7-10, 14, 24, 26; claims --- -/--	1-3, 6-12,14, 16-19,21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No.

PCT/EP 98/03832

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>WO 97 49816 A (DU PONT ; MAXWELL CARL ARTHUR (US); SCOLNIK PABLO ARIEL (US); WITTE) 31 December 1997</p> <p>abstract, page 2; page 3, lines 9-16; pages 10, 11, 14, 15; examples</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1-3, 6-11, 18-20, 22-24</p>
P, X	<p>GARCIA I ET AL: "SUBCELLULAR LOCALIZATION AND PURIFICATION OF A P-HYDROXYPHENYLPYRU-VATE DIOXYGENASE FROM CULTURED CARROT CELLS AND CHARACTERIZATION OF THE CORRESPONDING CDNA"</p> <p>BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 325, no. PART 03, 1 August 1997, pages 761-769, XP002070560 pages 761, 764; 763, right hand column; pages 766, 767; figure 3</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1, 2</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No

PCT/EP 98/03832

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9638567 A	05-12-1996	FR 2734840 A	06-12-1996
		FR 2734841 A	06-12-1996
		FR 2734842 A	06-12-1996
		AU 6228696 A	18-12-1996
		CA 2219979 A	05-12-1996
		CZ 9703809 A	18-03-1998
		EP 0828837 A	18-03-1998
		HR 960245 A	31-08-1997
		PL 323679 A	14-04-1998
WO 9727285 A	31-07-1997	AU 1845397 A	20-08-1997
WO 9749816 A	31-12-1997	AU 3644697 A	14-01-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In ationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/03832

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/82 C12N15/53 C12N9/02 C12N5/10 G01N33/50
A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N G01N A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
-----------	--	--------------------

X	WO 96 38567 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE ; SAILLAND ALAIN (FR); ROLLAND ANNE (FR)); 5. Dezember 1996 in der Anmeldung erwähnt Seite 1,2; Beispiele	1-3, 6-11, 22-24
Y		18-20
X	NORRIS, S.R., ET AL. : "arabidopsis plastoquinone and tocopherol biosynthetic mutants are also carotenoid deficient" PLANT PHYSIOLOGY, SUPPLEMENT, Bd. 111, Nr. 2, Juni 1996, Seite 40 XP002083334	1-3, 6-12,14, 16,17,21
Y	siehe das ganze Dokument	18-20

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. November 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27/11/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BARTA I C ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF 4-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXOGENASE FROM MAIZE" PESTICIDE SCIENCE, Bd. 48, Nr. 2, 1996, Seiten 109-116, XP000646540 Seiten 109, 110, linke Spalte; Seite 115 ---	20
X	LENNE C ET AL: "LOCALIZATION AND PARTIAL PURIFICATION OF P-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE FROM CULTURED CARROT CELLS" PHOTOSYNTHESIS: FROM LIGHT TO BIOSPHERE. PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL PHOTOSYNTHESIS CONGRESS, Bd. 5, 20. August 1995, Seiten 285-288, XP000646348 siehe Seite 288 ---	1
Y	"LARGE SCALE TESTING OF 4-HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE FOR THE DETECTION OF NEW HERBICIDAL LEADS" RESEARCH DISCLOSURE, Nr. 393, Januar 1997, Seite 73 XP000693711 siehe das ganze Dokument ---	18-20
A	NORRIS S R ET AL: "GENETIC DISSECTION OF CAROTENOID SYNTHESIS IN ARABIDOPSIS DEFINES PLASTOQUINONE AS AN ESSENTIAL COMPONENT OF PHYTOENE DESATURATION" PLANT CELL, Bd. 7, Dezember 1995, Seiten 2139-2149, XP002041909 Zusammenfassung, Seite 2140, linke Spalte; Seite 2141, rechte Spalte; Seiten 2142, 2143; Abb. 3, 4, 7 ---	1-24
P, X	KLEBER-JANKE, T. AND KRUPINSKA, K.: "isolation of cDNA clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced senescence as well as during senescence under field conditions" PLANTA, Bd. 203, November 1997, Seiten 332-340, XP002083335 Zusammenfassung, Seite 337; Seite 339, Abb. 2, 4; Tabelle 2 ---	1
P, X	WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA) 31. Juli 1997 Seiten 4, 6, 7-10, 14, 24, 26; Ansprüche --- -/--	1-3, 6-12, 14, 16-19, 21

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/03832

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>WO 97 49816 A (DU PONT ;MAXWELL CARL ARTHUR (US); SCOLNIK PABLO ARIEL (US); WITTE) 31. Dezember 1997</p> <p>Zusammenfassung, Seite 2; Seite 3, Zeile 9-16; Seiten 10,11,14,15; Beispiele</p> <p>---</p>	<p>1-3, 6-11, 18-20, 22-24</p>
P,X	<p>GARCIA I ET AL: "SUBCELLULAR LOCALIZATION AND PURIFICATION OF A P-HYDROXYPHENYLPYRU-VATE DIOXYGENASE FROM CULTURED CARROT CELLS AND CHARACTERIZATION OF THE CORRESPONDING CDNA"</p> <p>BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 325, Nr. PART 03, 1. August 1997, Seiten 761-769, XP002070560 Seiten 761,764; 763, rechte Spalte; Seite 766, 767; Abb.3</p> <p>-----</p>	<p>1,2</p>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/03832

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9638567 A	05-12-1996	FR 2734840 A	06-12-1996
		FR 2734841 A	06-12-1996
		FR 2734842 A	06-12-1996
		AU 6228696 A	18-12-1996
		CA 2219979 A	05-12-1996
		CZ 9703809 A	18-03-1998
		EP 0828837 A	18-03-1998
		HR 960245 A	31-08-1997
		PL 323679 A	14-04-1998
WO 9727285 A	31-07-1997	AU 1845397 A	20-08-1997
WO 9749816 A	31-12-1997	AU 3644697 A	14-01-1998